

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**SEKUNDARNI METABOLITI U MESOJEDNIH BILJAKA
IZ PORODICE DROSERACEAE**

**SECONDARY METABOLITES IN CARNIVOROUS
PLANTS FROM THE DROSERACEAE FAMILY**

SEMINARSKI RAD

Ida Svetličić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Zagreb, 2013

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SEKUNDARNI METABOLITI.....	2
2.1 Naftokinoni.....	3
2.2 Fenolni spojevi.....	5
3. IZOLACIJA I ANALIZA SEKUNDARNIH METABOLITA.....	7
4. UZGOJ MESOJEDNIH BILJAKA U UVJETIMA <i>in vitro</i>	8
5. ELICITACIJA SINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITA.....	10
6. LITERATURA.....	11
7. SAŽETAK.....	13
8. SUMMARY.....	13

1. UVOD

Vrste porodice Droseraceae odavna se koriste u narodnoj medicini; rosika je poznata po svojim učincima olakšavanja kašlja i plućnih bolesti. Za te su zdravstvene učinke zaslužni sekundarni metaboliti koji se nalaze u tkivu ovih biljaka. Sekundarni metaboliti su tvari koje nalazimo u biljkama, a produkti su primarnih metabolita, te im je ključna uloga ekološka interakcija između biljaka i okoliša. To su interakcije tipa alelopatija, obrana od patogena i herbivora, zaštita od zračenja i isušivanja itd. I danas se sekundarni metaboliti, koji se koriste u medicini, farmakologiji i kozmetičkoj industriji, često dobivaju iz biljaka na prirodnim staništima. S obzirom da se u današnje vrijeme rapidno smanjuje površina prirodnih staništa, sve veći značaj dobiva uzgoj mesojednih biljaka u uvjetima *in vitro*. U tim uvjetima biljka nije izložena pesticidima, okolišnom zagađenju i patogenima. Ipak, istraživanja pokazuju da upravo izloženost patogenima ili njihovim fragmentima potiče biljke na povećanu sintezu farmakološki aktivnih spojeva (Banasiuk i sur, 2012, Krolicka i sur, 2008, Ziaratnia i sur, 2008).

Karnivorna prehrana biljaka javlja se kao prilagodba na manjak nutrijenata u tlu. To se posebno odnosi na nedostatak dušika, kojeg mesojedne biljke dobivaju enzimatskom razgradnjom plijena uhvaćenog pomoću aktivnih ili pasivnih zamki (ovisno o nužnosti gibanja pri hvatanju plijena). Većinom su acidofilne vrste što podrazumjeva rast na tlu niže pH vrijednosti. Životinje koje ovim biljkama služe kao prehrana su najviše kukci, ali i veći beskralješnjaci i manji kralješnjaci. Kukce privlače živim bojama, lučenjem nektara i mirisnih ulja. Brojnost im se procjenjuje na oko 600 vrsta svrstanih u 6 redova i 20 rodova (Banasiuk i sur, 2012).

U porodici Droseraceae (rosike) nalazimo 3 roda: *Drosera*, *Dionaea* i *Aldrovanda*. *Drosera* je jedan od najvećih rodova karnivornih biljaka, a *Drosera rotundifolia* (slika 2.) je jedina mesojedna biljka koja raste u Hrvatskoj. Biljne vrste iz ovog roda hvataju plijen ljepljivim sekretom, čiji miris privlači kukce (Šamaj i sur, 1999). Aktivni način lova je pomoću rubnih i središnjih tentakula. Rubni tentakuli se na podražaj savijaju prema središnjim tentakulima, koji omogućavaju savijanje lista i ingestiju plijena. *Dionaea* je monotipski rod – sadrži samo vrstu *Dionaea muscipula* (venerina muholovka), slika 1. Mehanizam hvatanja plijena kod ove vrste vrlo je razvijen, te ona s pomoću svojih osjetilnih dlaka može razlikovati živi plijen od drugih podražaja kao što su kapljice kiše. Dvije različite dlačice moraju biti podražene u određenom vremenskom periodu ili jedna uzastupno podražena što signalizira promjenu akcijskog potencijala i zatvaranje klopke. *Aldrovanda*

vesiculosa jedini je predstavnik roda *Aldrovanda* (slika 3). Ona je akvatična vrsta s vrlo brzim mehanizmom aktivne zamke slične onoj kod *D. muscipula*.



Slika 1. *Dionaea muscipula*
(preuzeto sa www.carnivorousplants.org)



Slika 2. *Drosera rotundifolia*
(preuzeto sa www.kew.org)



Slika 3. *Aldrovanda vesiculosa*
(preuzeto sa www.carnivorousplants.org)

2. SEKUNDARNI METABOLITI

Zbog vrlo razvijenih bakterijskih mehanizama genetske prilagodbe, u zadnje vrijeme dolazi do naglog porasta otpornosti ljudskih patogena na antibiotike. Sekundarni biljni metaboliti predstavljaju moguće rješenje u borbi protiv rezistentnih sojeva bakterija, jer dokazano pojačavaju učinak često korištenih antibiotika i onih na koje su bakterije stekle otpornost.

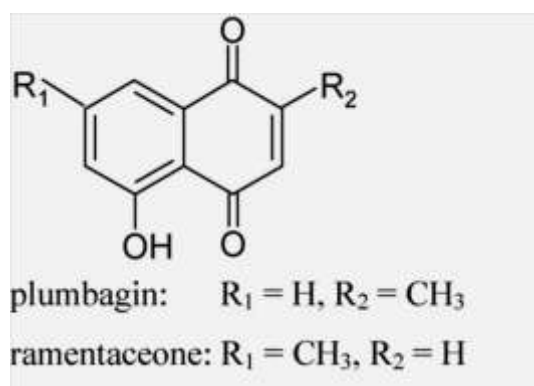
Biljni ekstrakti biljaka iz porodice *Droseraceae* (posebno *Drosera* sp. i *D. muscipula*) posjeduju brojna imunomodulatorna, protukancerogena, antispazmička i antimikrobna svojstva. Metaboliti s fitofarmaceutskim učincima pripadaju većinom naftokinonima i flavonoidima, iako su prisutni i cijanogeni glikozidi, elagična kiselina i drugi fenolni spojevi (Krolicka i sur, 2008). Zasad nisu dovoljno istraženi mehanizmi djelovanja pojedinih sekundarnih metabolita, te zašto određeni omjeri tih metabolita imaju jača antimikrobna djelovanja. Primjerice, u nekim slučajevima upravo je ekstrakt s manjim udjelom naftokinona imao mnogo bolji učinak nego ekstrakti koji su sadržavali veći udio ovih spojeva, koji se smatraju glavnim zaslužnim za antimikrobna svojstva mesojednih biljaka (Krolicka i sur, 2008).

2.1. NAFTOKINONI

Naftokinoni su derivati naftalena. Biosintetiziraju se različitim sintetskim putevima: acetatnim i malonatnim putem, kao i šikimatskim i mevalonatnim. Posjeduju brojna biološki aktivna svojstva: antimikrobno, fungicidno, antiparazitsko i insekticidno. Čine strukturu fiziološki važnih spojeva kao što su plastokinon, ubikvinon i vitamin K. Obično su žute do smeđe boje pa stoga imaju i pigmentacijsku ulogu. Najjednostavniji i u prirodi najčešći su juglon, lavson, plumbagin i lapahol (Tablica 1). Njihova citotoksična svojstva javljaju se jer djeluju inhibitorno na transportni lanac elektrona, stvaraju reaktivne radikale kisika i remete strukturu DNA. Također inhibiraju razvoj larvi insekata i djeluju toksično ili sedativno na morske organizme.

S obzirom na položaj naftalenskog supstituenta djelimo ih na 1,4-naftokinone i 1,2-naftokinone. Mogu biti monomerni, dimerni i trimerni. Gotovo svi su topljivi u benzenu, kloroformu, alkoholu, acetonu. Plumbagin i juglon su blago topljivi i u vrućoj vodi (Babula i sur, 2009). Analize ekstrakta biljaka roda *Drosera* pokazale su da među naftokinonima dominiraju plumbagin i njegov izomer 7-metiljuglon (ramentaceon), (slika 4). Oni su prisutni u slobodnom obliku ili vezani u glukozidima kao hidroplumbagin 4-O-glukozid i 7-metiljuglon 4-O-glukozid (rosolizid). Plumbagin u listovima *Drosera*, *Dionaea* i *Aldrovanda* obično čini 2-3% mase suhe tvari (Adamec i sur, 2006). Za razliku od plumbagina i ramentaceona, naftokinoni drazeron i hidroksidrazeron, te njihovi glukozidi su ograničeni samo na vrste porodice Droseraceae (Banasiuk i sur, 2009). Iz *D. muscipula* izolirane su dvije tvari, diomuscion i muscipulon, koje su biosintetski povezane s plumbaginom (Babula i sur, 2009). Omjeri pojedinih naftokinona ovisni su o količini ugljika i dušika, temperaturi i pH vrijednosti (Babula i sur, 2006). Ukupna količina ovisi i o stadiju razvoja biljke. Primjećeno je da mlađe biljke sadrže veću količinu naftokinona nego starije (Kämäräinen i sur, 2003).

Istraživanja su pokazala da plumbagin inducira smrt stanica raka. Posebno snažna antibakterijska svojstva pokazuje prema oralnim bakterijama (*Streptococcus*), a bakterije koje su rasle u njenoj prisutnosti nisu razvile rezistenciju na antibiotike streptomycin i rifamicin (Banasiuk i sur, 2012). Utvrđeno je da oba naftokinona pokazuju veći bakteriocidni učinak prema Gram pozitivnim sojevima bakterija, dok je učinak na Gram negativne bakterije nešto slabiji (Krolicka i sur, 2008).



Slika 4. Kemijska struktura plumbagina i ramentaceona
 (preuzeto iz Babula i sur, 2006)

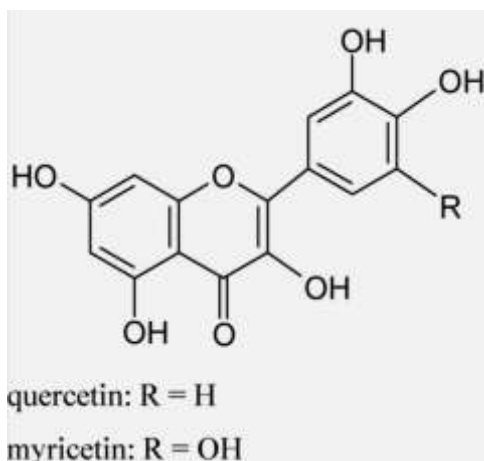
Tablica 1. Popis najvažnijih naftokinona i njihova svojstva (preuzeto iz Banasiuk i sur, 2012)

Supstituent	sistematski naziv	trivijalni naziv	talište [°C]	relativna molekulska masa
	1,4-naftokinon		119-120	158.15
$R_1 = CH_3, R_3 = OH$	5-hidroksi-2-metil-1,4-Naftokinon	Plumbagin	78-79	188.18
$R_3 = OH$	5-hidroksi-1,4-naftokinon	Juglon	155	174.14
$R_1 = CH_3$	2-metil-1,4-naftokinon	Menadion	105-107	172.18
$R_3, R_6 = OH$	5,8-dihidroksi-1,4-naftokinon	Naftazalin	237	190.16
$R_1, R_3, R_5 = OH$	2,5,7-trihidroksi-1,4-naftokinon	Flaviolin	164-168.5	206.17
$R_1 = CHOCH_2CH=C(CH_3)_2$ $R_3, R_6 = OH$	5,8-dihidroksi-2-(1-hidroksi-4-metilpent-3-enil)-1,4-naftokinon	Šikonin	145-146	288.30
$R_1 = OH$ $R_2 = CH_2CH=C(CH_3)_2$	2-hidroksi-3-(3-metil-but-2-enil)-1,4-naftokinon	Lapahol	141-143	242.27

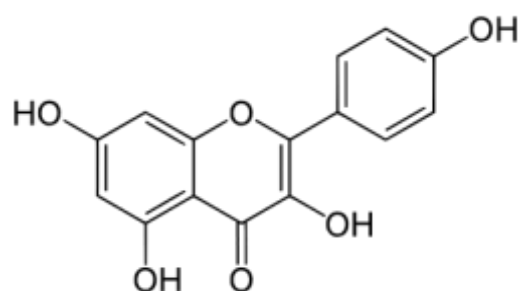
2.2. FENOLNI SPOJEVI

Druga skupina važnih sekundarnih metabolita porodice Droseraceae su fenolni spojevi, koji imaju brojne uloge kao što su zaštita od UV zračenja, antioksidativno djelovanje, sinteza prekursora tosičnih tvari, inhibicija enzima i privlačenje kukaca. Najčešće se nalaze otopljeni u staničnom soku. Aktivnost im određuje slobodna hidroksilna skupina, a sintetiziraju se većinom šikimatskim biosintetskim putem (iz eritroza-4-fosftata i fosfoenolpiruvata), ali manjim djelom i malonatnim putem iz acetyl-CoA.

Među fenolnim spojevima iz porodice Droseraceae najzastupljeniji su flavonoidi kamferol (slika 6), kvercetin i mircetin (slika 5). Skelet flavonoida sastoji se od 15 ugljikovih atoma u strukturi C₆-C₃-C₆ odnosno 2 aromatska prstena povezana mostom od 3 C atoma. Zajednički prekursor svih flavonoida je halkan i njegovi derivati 2-hidroksihalkan i trihidroksihalkan (Banasiuk i sur, 2012). Na stanice sisavaca kao i drugih organizama imaju djelovanje i u in vitro uvjetima. Zbog interakcija sa kardiovaskularnim sustavom neki flavonoidi se koriste za prevenciju natečenih vena, ekstrasvazacije i ateroskleroze. Djeluju kao antihistaminici i imitiraju svojstva ljudskog estrogena. Kamferol je kompetativni inhibitor ATP-a, dok kvercetin i mircetin djeluju kao inhibitori gliksilaznih enzima koji možda imaju važnu ulogu u regulaciji stanične diobe. Pokazalo se da kvercetin ima antikancerogeno djelovanje; inhibira mutageno djelovanje kancerogena benzopirena. Njihova helatna aktivnost (Fe³⁺, Cu²⁺) pomaže biljci da se nosi s teškim metalima. Najzanimljivije je njihovo antimikrobno djelovanje (Banasiuk i sur, 2012). Flavonoidi i njihovi glikozidi imaju sinergističko djelovanje. Glikozidi flavonoida ne pokazuju zasebno antimikrobno djelovanje ali u prisutnosti aglikona pojačavaju njihov učinak. Primjer za ovu pojavu je kvercetin i njegov glikozid kvercetin-3-rutinozid. Flavonoidi potiču na djelovanje i druge sekundarne metabolite, ali i antibiotike, vjerojatno povećavajući permeabilnost bakterijske membrane i određenog antimikroba (Krolicka i sur, 2008). Bolje su topljivi u alkoholu nego kloroformu, pa se za njihovu ekstrakciju iz biljnog materijala najčešće koriste metanol i etanol (Banasiuk i sur, 2012).

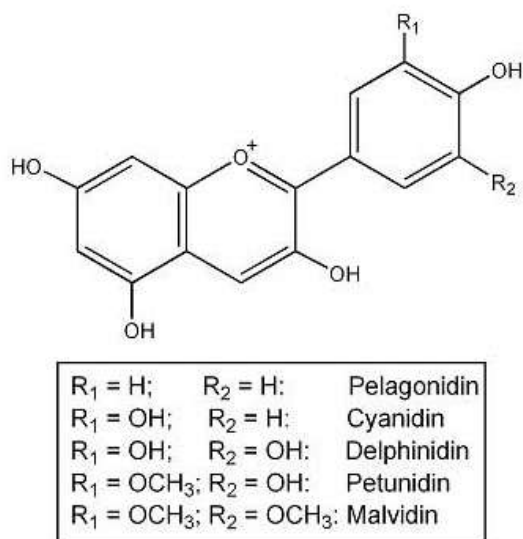


Slika 5. Kemijska struktura kvarcetina i mircetina
(preuzeto iz Babula i sur, 2006)



Slika 6. Kemijska struktura kamferola
(preuzeto sa <http://bioreagent.bertinpharma.com>)

Antocijani su obojeni flavonoidi crvene, ljubičaste i plave boje. Oni su glikozidi antocijanidina sa šećerom najčešće na poziciji 3 (slika 7). Uloga u biljkama im je privlačenje polinatora i (u slučaju mesojednih biljaka) plijena. U fotosintetskim tkivima štite stanice od štetnog zračenja apsorbirajući plavo i UV svjetlo. Koncentracija im stoga raste kod izloženosti biljke većim intenzitetima svjetlosti (Taiz i Zaiger, 2010). Antocijani su zaslužni za crvenu pigmentaciju listova u nekoliko vrsta *Dioneae* i *Drosera*. *Dionaea muscipula* tako sadrži antocijane delfinidin 3-O-glukozid i cijanidin 3-O-glukozid (krizantemin). Crveno lišće više privlači plijen nego zeleno. Analizom koncentracija antocijana u ovisnosti o koncentraciji makrosupstituentata, utvrđeno je da ove biljke u uvjetima smanjene koncentracije nutrijenata gomilaju crveni pigment. Crvenim obojenjem veća je mogućnost hvatanja plijena iz kojeg će karnivorne biljke dobiti hranjive tvari koje ne mogu apsorbirati korijenskim sustavom (Ichiishi i sur, 1999). Na ovaj način karnivorne biljke kombiniraju način uzimanja nutrijenata ovisno o uvjetima staništa na kojem se nalaze. Ostali flavonoidi zastupljeni u porodici Droseraceae su izokvarcetin, gosipin, gosipitrin, astragalín, hipetrin (Kováčik i sur, 2011).



Slika 7. Osnovna struktura antocijanidina i supstituenti najčešćih antocijana
(preuzeto sa <http://lpi.oregonstate.edu>)

3. IZOLACIJA I ANALIZA SEKUNDARNIH METABOLITA

Napredak u području analitičkih tehnika za što efikasniju determinaciju i izolaciju biološki aktivnih tvari, jedan je od glavnih zadataka današnje biokemije, analitičke kemije i farmacije. Mjerenje razine sekundarnih metabolita potrebno je kako bi se zaključilo kako uvjeti kultivacije utječu na njihovu distribuciju i ekspresiju.

Prvi korak ekstrakcije sekundarnih metabolita je maceracija biljnog materijala, često uz dodatak tekućeg dušika za bolju penetraciju tkiva. Biljni uzorak za bolje rezultate treba biti što svježiji (Banasiuk i sur, 2012).

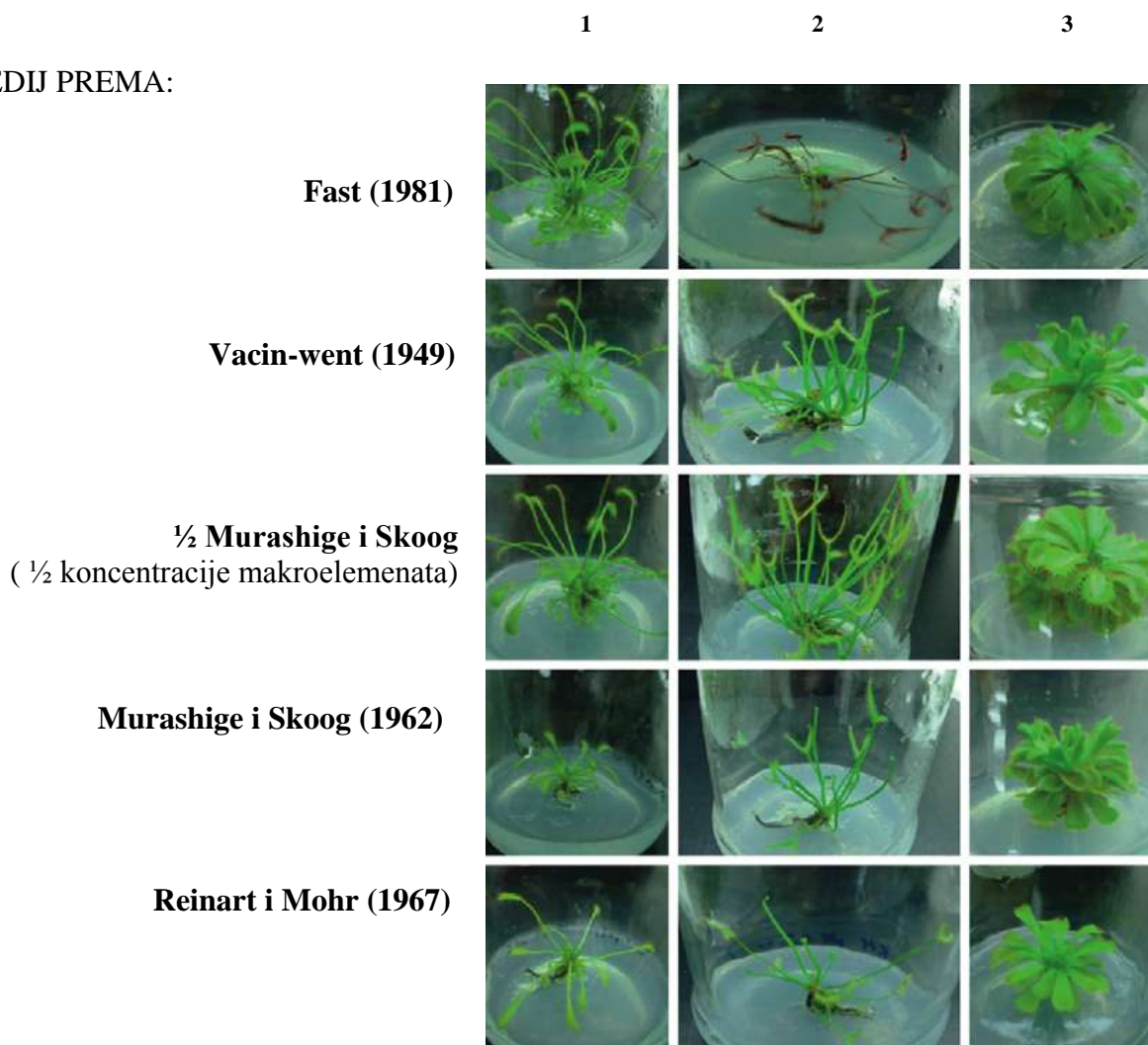
Pokazalo se da je metanol najpogodnije otapalo za ekstrakciju naftokinona iz uzoraka mesojednih biljaka (*Dionaea muscipula*, *Drosera rotundifolia*, *Drosera spathulata* i *Drosera capensis*) i to pri temperaturi 40-50 °C. Analizom pomoću HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection) utvrđeno je da *D. muscipula* sadrži daleko najveću koncentraciju naftokinona plumbagina u odnosu na ostale ispitane uzorke. Najčešći način analize naftokinona je korištenjem HPLC sa UV detektorom i elektrokemijske metode (Babula i sur, 2006).

Za istraživanja fenolnih tvari također se koristi HPLC, a pogodno otapalo za ekstrakciju je ponovno metanol. Za kvantifikaciju određenih flavonoida (kamferola i kvarcetina) u supernatant se prije kromatografije dodaje 2M otopina HCl i slijedi zagrijavanje da bi se dobio aglikonski dio molekule kojeg je lakše usporediti sa postojećim standardima aglikona. U istraživanju Kováčik i sur (2011) kvercetin je bio najkoncentriraniji u svim mesojednim biljkama. Listovi mesojednih biljaka prethodno su odvojeni na asimilacijski i probavni dio. Najviše kamferola sadrži *D. muscipula*, a najveću ukupnu sumu flavonoida ima probavni dio *Drosera*. S obzirom da je fenil amonij lijaza (PAL) enzim koji u najvećoj mjeri kontrolira sintezu fenola, u istraživanjima se ponekad mjeri i njegova aktivnost, i to HPLC detekcijom produkta njegove reakcije odnosno trans-cimentne kiseline. Asimilacijski dio lista *Drosera* pokazuje najveću aktivnost PAL enzima a slijedi ga probavni dio *Dionaeae*. Osim u slučaju *Drosera*, probavni dio je pokazivao veću aktivnost PAL u odnosu na asimilacijski dio listova. Mogući razlog velike razlike između aktivnosti PAL u asimilacijskom i probavnom dijelu lista *Drosera* je prisutnost probavnih enzima u ljepljivom sekretu koji se luči u probavnom dijelu. Probavni enzimi mogu utjecati na aktivnost i očuvanje drugih enzima (uključujući i PAL) unutar lista tokom uzorkovanja i homogenizacije (Kováčik i sur, 2011).

4. UZGOJ MESOJEDNIH BILJAKA U UVJETIMA *in vitro*

Brojne vrste iz porodice Droseraceae pripadaju ugroženim i zaštićenim vrstama. Ugrožene su zbog intenzivnog uništenja njihovog prirodnog staništa do kojeg dolazi u posljednje vrijeme. Smanjenju njihovog broja doprinosi i činjenica da imaju vrlo malu stopu razmnožavanja u prirodi. S obzirom da sintetski lijekovi imaju brojne nuspojave i često bitno drugačija djelovanja od prirodnih ekvivalenata, sve se više ukazuje na važnost prirodnih lijekova kao što je ekstrakt mesojedne biljke, što dovodi do velike potražnje za ovim vrstama. Zbog ugroženosti mesojednih vrsta, rješenje predstavlja njihova *in vitro* kultivacija. Najčešće se uzgajaju iz sjemenki, eksplantacijom lista i korijena ili iz gomolja. Sjemenke moraju biti izložene nižoj temperaturi prije klijanja (oko 4 °C). Najveći značaj ima propagacija eksplantacijom iz lista. Procijenjeno je da se vegetativnom propagacijom iz jednog eksplantata lista može dobiti 100-300 biljaka klonova tokom jedne godine (Banasiuk i sur, 2012). Time se značajno povećava stopa razmnožavanja. Optimalni medij za uzgoj različit je za svaku vrstu (slika 8), a njegov pH je niži u sukladnosti s kiselim prirodnim staništem mesojednih biljaka.

MEDIJ PREMA:



Slika 8. Rast vrsta 1) *Drosera anglica*, 2) *Drosera binata* 3) *Drosera cunefolia* ovisno o tipu medija (preuzeto sa Banasiuk i sur, 2012).

Najširi opseg antimikrobne aktivnosti pokazali su ekstrakti mesojednih biljaka koji su rasli na mediju smanjene koncentracije dušika, a to je ½ Murashige & Skoog (Banasiuk i sur, 2012). Najveća koncentracija fenolnih tvari također je zamijećena u mediju s manjkom dušika (Kováčik i sur, 2010). U medij se dodaju regulatori rasta: auksini, citokinini i giberelini, iako citokinini u većoj koncentraciji smanjuju rast i razvoj *Drosera* sp. Analize uzgojenih biljaka pokazale su da kulture *in vitro* često imaju manju koncentraciju sekundarnih metabolita nego vrste s prirodnih staništa. Objašnjenje ove pojave je sama uloga sekundarnih metabolita kao glavne obrane biljke od patogena; sintetiziraju se kao odgovor biljke u dodiru s mikrororganizmima koji nedostaju u normalnim uvjetima uzgoja *in vitro*.

5. ELICITACIJA SINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITA

Povećana sinteza sekundarnih metabolita u uvjetima *in vitro* uspješno se postiže dodatkom elicitora ili prekursora sekundarnih metabolita. (Krolicka i sur, 2008). Elicitori su tvari biološkog ili nebiološkog podrijetla koji, u doticaju sa stanicama viših biljaka, potiču povećanu sintezu sekundarnih metabolita. Dolazi do indukcije biljnih obrambenih mehanizme i sinteze enzima koji sudjeuju u biosintezi sekundarnih metabolita. S obzirom na podrijetlo tvari koje suže kao elicitori, elicitacija može biti biotička i abiotička. Ponekad dodatak elicitora može izazvati sintezu tvari koje biljka inače ne stvara. Važno je paziti na uvjete elicitacije; vrstu elicitora i podloge (Banasiuk i sur, 2012).

Ekstrakt kvasca u *D.burmanii* izaziva veliku produkciju plumbagina (Banasiuk i sur, 2012). Djelovanjem autoklavirane suspenzije *Agrobacterium rhizogenes*, elicitora *Verticillium dahliae*, jasmonske kiseline ili manjka dušika dolazi do akumulacije plumbagina (u kulturi *D. muscipula*) i ramentaceona (u kulturi *Drosera capensis*) Također, *D. muscipula* elicitirane lizatom *A. rhizogenes* koje su rasle u prisutnosti L-fenilalanina imale su crvenkasto obojenje što upućuje na pojačanu sintezu antocijana (Krolicka i sur, 2008)

Prekursori sekundarnih metabolita često djeluju kao elicitori. Dodatkom prekursora šikimatskog biosintetskog puta: L-fenilalanina i trans-cimetne kiseline, kulture *D. muscipula* i *D. capensis* uzgajane u uvjetima *in vitro* imale su visoki udio flavonoida kvercetina i mircetina (Krolicka i sur, 2008).

Druga metoda za povećanje produkcije sekundarnih metabolita u uvjetima *in vitro* je kontrolirana infekcija mesojedne biljke bakterijom *A. rhizogenes*. To je Gram negativna, štapičasta bakterija, inače prisutna u tlu. Ona posjeduje Ti-plazmid (tumor inducirajući) na kojem se nalazi T-DNA (transferna) koja se ugrađuje u bakterijski kromosom. Ovom transformacijom u biljku se prenose onc geni. Biljke razvijaju tumore, a istraživanje na *Drosera sp.* pokazalo je da je u takvim biljkama koncentracija naftokinona veća. Dodatna indukcija sinteze naftokinona postiže se dodatkom elicitora (jasmonske kiseline). HPLC analiza pokazala je 60 % veću koncentraciju ramentaceona. Nadalje, transformirane biljke pokazuju i 3 puta veću stopu rasta jer dolazi do brze akumulacije biomase (Banasiuk i sur, 2012).

Problem s ovim postupkom indukcije sinteze sekundarnih metabolita je različita reakcija pojedine vrste porodice Droseraceae na infekciju *A. rhizogenes*. Razlog su upravo snažna antimikrobna svojstva ove skupine zbog čega se uspješno transformira manji broj biljaka (Banasiuk i sur, 2012).

6. LITERATURA

- Adamec L, Gastinel L, Schlauer J, 2006. Plumbagin content in *Aldrovanda vesiculosa* shoots. *Carniv. Plant Newsletter*, 35, 52-55
- Babula P, Adam V, Havel L, Kize R, 2009. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5, 47-68
- Babula P, Mikelova R, Adam V, Kizek R, Havel R, Sladky Z, 2006. Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*. *Journal of Chromatography B*, 842, 28–35
- Banasiuk R, Kawiak A, Królicka A, 2012. In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 93(2), 87-96
- Ichiishi S, Nagamitsu T, Kondo Y, Iwashina T, Kondo K, Tagashira N, 1999. Effects of Macro-components and Sucrose in the Medium on in vitro Red-color Pigmentation in *Dioneae muscipula* Ellis and *Drosera spathulata* Labill. *Plant Biotechnology*, 16 (3), 235-238
- Kämäräinen T, Uusitalo J, Jalonen J, Laine K. Hohtola A, 2003. Regional and habitat differences in 7-methyljuglone content of Finnish *Drosera rotundifolia*. *Phytochemistry* 63, 309-314
- Kováčik J, Klejdus B, Repčáková K, 2012. Phenolic metabolites in carnivorous plants: Inter-specific comparison and physiological studies. *Plant Physiology and Biochemistry* 52, 21-27
- Kováčik J, Klejdus B, Štork F, Hedbavny J, 2010. Prey-induced changes in the accumulation of amino acids and phenolic metabolites in the leaves of *Drosera capensis* L. *Amino acids* 42, 4
- Krolicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romanik G, Kaminski M, Lojkowska E, 2008. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 216–221
- Šamaj J, Blehova A, Repčák M, Ovečka M, Bobák M, 1999. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 43, Medicinal and aromatic plants 11, 8, 105-107
- Taiz L, Zeiger E, 2012. *Plant physiology* 5th edition, 13, 283-307
- Ziaratnia S. M, Kunert K. J, Lall N, 2009. Elicitation of 7-methyljuglone in *Drosera capensis*. *South African Journal of Botany* 75, 97–103
- bioreagent.bertinpharma.com

lpi.oregonstate.edu

www.carnivorousplants.org

www.kew.org

7. SAŽETAK

Zbog nedostataka umjetno sintetiziranih lijekova, sve se više radi na otkrivanju zdravstvenih učinka biljnih ekstrakta koji bi mogli imati važnu ulogu u borbi protiv raka i drugih bolesti. Naftokinoni i flavonoidi su najvažniji sekundarni metaboliti mesojednih biljaka iz porodice Droseraceae. Pokazalo se da imaju brojna farmakološka djelovanja među kojima je ublažavanje kašlja ali i uništavanje tumorskih stanica. Zbog sve manje površine njihovog prirodnog staništa, biljke porodice Droseraceae zakonom su zaštićene vrste u mnogo zemalja. Kako bi bila osigurana dovoljna količina biljnog materijala za ekstrakciju medicinski korisnih sekundarnih metabolita, potreban je intenzivan uzgoj ovih biljaka u kulturama *in vitro*. Dodatkom elicitora u medije za uzgoj postiže se vrlo visoki prinos naftokinona i flavonoida. Ključno je istražiti prave uvjete za uzgoj *in vitro*, kao što su koncentracija i vrsta nutrijenata i elicitora, te optimalni pH medija za pojedinu vrstu. Također treba dodatno istražiti i međudjelovanje pojedinih sekundarnih metabolita da bi se utvrdilo u kojim je uvjetima ono sinergističko, a u kojim antagonističko.

8. SUMMARY

Due to the flaws of artificially synthesized drugs, more work is being done on discovering health effects of plant extracts which could play an important role in fighting cancer and other diseases. Naphtoquinons and flavonoids are the most important secondary metabolites in carnivorous plants from the family Droseraceae. It has been shown that they have numerous pharmacological effects, including mitigation of cough and destruction of tumor cells. Due to ever-smaller areas of their natural habitat, the plant family Droseraceae is legally protected species in many countries. In order to ensure a sufficient amount of plant material for medically useful secondary metabolites extraction, intensive *in vitro* cultivation of these plants is required. By adding elicitors to the culture medium, high income in naphtoquinon and flavonoid content is achieved. The key is to explore the right conditions to grow these plants *in vitro*, such as the concentration and type of nutrients and elicitors, and the optimum pH for each type of media. The interaction of certain secondary metabolites should also be further explored to find out in which conditions it is synergistic and in which antagonistic.